

37
2aj



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

METODOS SIMPLES PARA LA EVALUACION DE
ACTIVIDAD BIOLOGICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ERNESTINA DURAN MURILLO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO

1	INTRODUCCION	1
2	GENERALIDADES	4
	2.1.-Pruebas Farmacológicas	4
	2.2.-Pruebas Biológicas	5
	2.2.1.-Pruebas en Organismo Aislado	5
	2.2.2.-Cultivos y Suspensiones Celulares	8
	2.2.3.-"Otros Ensayos"	17
	2.2.4.-Métodos Microbiológicos	18
	2.3.-Clasificación de Métodos de Cernimiento	21
3	PARTE EXPERIMENTAL	24
	3.1.-Bioensayo con <u>Artemia salina L.</u>	24
	3.2.-Ensayo en Disco de Papa para la Evaluación de la Acción Antitumoral	31
	3.3.-Método Bioautográfico para valorar Actividad Antibacteriana y Antifúngica	37

	3.4.-Viabilidad en Células Epiteliales:Método de Exclusión con Azul tripan	43
4	RESULTADOS Y DISCUSION	49
	4.1.-Bioensayo con <u>Artemia salina L.</u>	49
	4.2.-Ensayo en Disco de Papa para la Evaluación de la Acción Antitumoral	56
	4.3.-Método Bioautográfico para valorar Actividad Antibacteriana ó Antifúngica	67
	4.4.-Viabilidad en Células Epiteliales:Método de Exclusión con Azul tripan	87
5	CONCLUSIONES	101
6	BIBLIOGRAFIA	104

1. INTRODUCCION

Las innovaciones de la ciencia están a menudo basadas en las carencias ó necesidades de la humanidad.

Hoy en día "progreso" es un lema muy empleado, los hombres de ciencia tienen la tarea de realizar progresos en los fármacos ya existentes, sin olvidar la seguridad primero y desarrollar otros nuevos que lleven a cabo su objetivo de aliviar ó curar un padecimiento en los individuos que los reciben dentro de un tratamiento.

Es necesario que se descubran nuevos compuestos activos capaces de combatir padecimientos como el cáncer y el sida, por citar algunos, lo cuál sería un logro para la ciencia como lo fué en su tiempo, la introducción en la terapéutica de los antibióticos del tipo de las cefalosporinas y la estreptomina(1).

Para llevar a cabo lo anterior se necesitó valorar la actividad biológica de compuestos que provee la naturaleza ó de aquellos que el mismo hombre sintetiza.

Este objetivo primordial se logra utilizando pruebas, que se realizan con microorganismos, con organismos simples, con órganos de diversos animales superiores, con los mismos animales completos ó aún empleando al hombre mismo como sistema experimental, este último caso va precedido de una amplia gama de pruebas de otro tipo.

En compuestos que son aislados y caracterizados sin ninguna prueba biológica anterior, su actividad biológica permanece desconocida, a pesar de que existan ensayos propios para este fin pero la razón es que estos son costosos y no son lo bastante disponibles para realizar un estudio preliminar de cualquier planta ó intermediario sintético. La necesidad de realizar bioensayos generales que detecten un amplio rango de actividades biológicas y se extiendan, como una guía para un cernimiento fitoquímico y el ensayo de intermediarios de reacción, condujo a la búsqueda de técnicas rápidas y económicas que puedan realizarse en condiciones simples de experimentación. Utilizando como medio principal de experimentación Artemia salina L., crustáceo a menudo utilizado como alimento de peces, disponible a un costo bajo y de fácil manipulación (proporcionando un gran número de larvas sus huevecillos). Todo

esto se puede utilizar para efectuar el monitoreo fraccionado de un extracto natural ó de un intermediario sintético(20).

Las pruebas biológicas en general son variadas en la metodología que siguen, pudiendo ir desde lo más sencillo hasta lo más complejo, ser económicas o de un alto costo.

El objetivo de este trabajo es realizar una selección de pruebas biológicas con metodología sencilla, llevando a cabo algunas de estas pruebas en forma experimental. El requisito común de estas pruebas es que deben realizarse bajo condiciones simples de experimentación, con equipo y materiales accesibles y considerando que posiblemente serán realizadas por personas poco experimentadas en procedimientos biológicos y que deberán así mismo interpretar los resultados de dichas pruebas.

simples ó complejas, económicas ó de alto costo todas las pruebas biológicas deben cumplir con el objetivo que originó su selección y por consiguiente su realización.

2. GENERALIDADES

2.1.-Pruebas Farmacológicas

La farmacología estudia a los fármacos relacionando su estructura química con la actividad biológica y la posible aplicación terapéutica del mismo, y aunque todos los aspectos son importantes aquí sólo nos enfocaremos a las pruebas que determinan su actividad biológica(2).

Con el desarrollo de métodos experimentales para determinar la acción biológica en animales y el hombre, se presentó la oportunidad de separar a los compuestos eficaces ó activos de los inactivos; es decir efectuar un cernimiento farmacológico y establecer un procedimiento que determine si un compuesto tiene ó no alguna actividad deseable. Para esto el fármaco se somete a un número de pruebas, las cuales emplean animales íntegros, órganos aislados, cultivos celulares y al hombre; así la identificación de compuestos nuevos con actividad biológica ó la búsqueda de efectos diferentes en los ya existentes, requiere la realización de ciertas pruebas en sistemas específicos.

El cernimiento de compuestos activos implica una evaluación que está dirigida a la selección de técnicas convenientes para valorar y detectar la actividad que pueda tener el compuesto en cuestión; estas pruebas deben presentar ciertas características que permitan hacer una selección apropiada a los fines que más convengan. Tales pruebas se realizan in vivo con animales enteros ó en sistemas específicos que permitan aportar información sobre las acciones que causa el compuesto activo en estudio; como ejemplo de estas tenemos a las pruebas neurofarmacológicas usadas generalmente para detectar las acciones sobre SNC; existen otras pruebas en las que se consideran parámetros propios del sistema como las realizadas en sistema digestivo para determinar actividad antiulcerosa antisecretora y gástrica, sistema cardiovascular para analizar las acciones de los compuestos en estudio sobre presión arterial, sistema respiratorio para valorar la acción antiasmática, antitusiva y analéptica, etc.

2.2.-Pruebas Biológicas

2.2.1) Pruebas en órgano aislado

Las pruebas en individuos ó en sistemas completos son sumamente complejas, por esta razón se han usado tradicionalmen

te las pruebas en órgano aislado. Por ejemplo las pruebas en sistema cardiovascular que se pueden simplificar con bioensayos en órgano aislado, como son las pruebas en aurícula y corazón perfundido, presentan ventajas tales como 1) permitir la cuantificación de la respuesta en forma precisa, 2) conocer la concentración activa del fármaco y 3) impedir la interferencia de las respuestas de tipo reflejo.

Las más usadas en sistema gastrointestinal son en ileon de cobayo, utilizando la parte distal por tener mayor sensibilidad para el estudio de la actividad farmacológica en musculatura lisa intestinal, el intestino de rata empleado para valorar la acción neurótropa, de los compuestos parasimpaticolíticos, intestino de conejo que presenta una actividad espontánea con contracciones y relajaciones rítmicas duraderas, duodeno de rata usado para valorar la actividad biológica de espasmolíticos, yeyuno de cobayo que presenta una notable actividad espontánea que se prolonga a veces por varias horas, aurícula de cobayo ó conejo usada en el estudio de la actividad de algunos fármacos sobre la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca.

Dentro de este grupo tenemos ejemplos más concretos como el estudio de Fontaine J. y Reuse J.(3) que valoran los efectos de morfina y algunos fármacos narcóticos sobre cólon aislado de ratón, los compuestos a probar se dejan en contacto con el órgano por períodos de 2 a 3 minutos con intervalos de 15 minutos, determinando con la ayuda de curvas dosis-respuesta la dosis efectiva 50 y el promedio de la respuesta máxima de concentración; encontrando que la morfina produce contracciones dependientes de la dosis sobre la capa muscular del cólon, siendo la respuesta rápida y sostenida. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de receptores opiáceos excitatorios que son estimulados con bajas concentraciones de morfina y otros opiáceos.

Otro ejemplo está representado por los trabajos de Andersson Rolf G. G., y col.(4) que utilizan otro método, dentro de este mismo grupo, valorando la actividad de un grupo de 4-amino-3-benzilidenedihidrazin-1,2,4-triazoles sobre el tono muscular del intestino, estos triazoles están estructuralmente relacionados con la clonidina, que es un potente agonista de los adrenoreceptores alfa, con acción antihipertensiva y que inhibe la liberación de los neurotransmisores adrenérgicos y co-

linérgicos; además de inhibir el tono muscular traqueal, por lo tanto los triazoles muestran actividad tipo clonidina y que inhiben la secreción de histamina de los basófilos.

2.2.2).-Cultivos y suspensiones celulares

Otro tipo de pruebas aún más simples, son aquellas que se realizan en células aisladas, extraídas de un animal ó que provienen de una planta y que pueden mantenerse vivas a través de cierto tiempo, estos tipos de ensayos son los cultivos y suspensiones celulares que sirven preferentemente para estudios sobre la actividad de agentes antivirales, anticarcinogénicos y todos aquellos que afecten el crecimiento ó propiedades de las células provenientes de tejidos líquidos, como son los eritrocitos, leucocitos, linfocitos, etc.

Tanto los cultivos como las suspensiones celulares representan un buen instrumento de estudio, con las ventajas de que no intervienen para nada los impulsos nerviosos y no hay cambios en la acción biológica del compuesto que se está valorando, provocados por mecanismos de excreción ó de otra índole, como puede suceder al emplear animales completos u órganos aislados. Además representan un libre acceso al compuesto

con una población igual en un medio que puede ser variado en forma controlada, no son sistemas complejos y llegan a ser de fácil manejo(5). Estos sistemas celulares pueden ser de células procariotas ó eucariotas según las necesidades, ambos ensayos se realizan en condiciones in vitro al igual que las de órgano aislado.

Profundizando más en este grupo de pruebas se puede mencionar que un cultivo primario no puede ser considerado como representativo del tejido original, pero aún así su multiplicación celular no es limitada, con excepción de las células humanas normales que limitan su multiplicación celular; sólo las de ratón y otras especies soportan multiplicarse por tiempo indefinido in vitro.

Los cultivos se obtienen formando monocapas de células, contiguas al sustrato sólido ó se forman suspensiones celulares en un medio líquido; el medio pueda contener minerales, vitaminas, glucosa, aminoácidos, suero, etc., según los requerimientos y es susceptible de cambio.

Schindler(5), dice que para determinar número y multiplicación celular se recurre a métodos microscópicos ó dispositio

vos electrónicos, midiendo inclusive componentes celulares específicos como DNA.

Además en la valoración del daño celular provocado por los agentes farmacológicos se opta por métodos en los cuales se determina viabilidad celular.

Otras ventajas que representan estos métodos, es el incremento de la reproducibilidad experimental por la posibilidad de congelar las células viables por períodos prolongados de tiempo sin que sufran cambios en sus características celulares ya que el peligro de infección en los cultivos por virus u otros microorganismos es prácticamente nulo, y la homogeneidad de sus respuestas a los agentes farmacológicos aumenta por el uso de técnicas sincronizadas que valoran la actividad de los agentes cuando las células se encuentran en una fase específica del ciclo celular. Por otra parte, la utilidad de los cultivos para el cernimiento de fármacos se ve limitada y tienen que ser usados solamente para un cernimiento primario con el fin de detectar compuestos con posible actividad biológica. Este tipo de técnicas nos puede llevar a obtener "falsos positivos" y "falsos negativos", los primeros son reconocidos

en un segundo sistema de prueba, como trasplantes de tumores en animales de experimentación y los negativos son desechados por estudios subsecuentes, pero siempre y cuando los cultivos hayan sido usados durante el cernimiento primario. Para propósitos más específicos los cultivos de células son de valor considerable; como en el caso de purificación de antibióticos con actividad citotóxica, en grupos de compuestos con estructura química similar; permitiendo la detección del compuesto más activo ó seleccionar el fármaco más prometedor para combatir determinado padecimiento.

También son utilizados para establecer y estudiar la relación estructura-actividad, mecanismo de acción del fármaco y mecanismo de resistencia que presentan las células hacia el fármaco(5).

Schindler, también manifiesta que debido a la introducción de los cultivos celulares como métodos de estudio se han hecho importantes contribuciones en la farmacología de compuestos activos los cuales de alguna forma modifican los procesos proliferativos a través de su actividad biológica. Así los estudios realizados en cultivos in vitro conducen al me-

por entendimiento de la actividad, modo de acción y mecanismos de ciertos fármacos. En comparación con pruebas más complejas, los cultivos ofrecen varias ventajas, como el libre acceso del compuesto a las células, poblaciones celulares homogéneas con medio ambiente estrictamente controlado que puede ser variado.

Como ejemplo de estas técnicas existe un bioensayo de citotoxicidad en células de Leucemia L 1210 en el cual se prueba la toxicidad de 14 clases de ésteres de ácidos alcanosulfónicos, isotiónicos, trifluorometanosulfónico y trifluoroetanosulfónico, determinando su actividad sobre las células por medio del método de viabilidad celular con azul tripan, los resultados obtenidos se refieren a la concentración que se necesita para obtener una reducción en la concentración celular en un 50%; el ensayo se realiza en células de mamífero determinando el agente más activo(6).

En otro ejemplo Cheng J. T. y col.(7), realizan una investigación acerca del efecto del ácido ascórbico sobre el crecimiento celular colocando a los cultivos celulares dentro de tres grupos, uno con la cantidad deseada de ácido ascórbico,

otro tratado con agua de relativa acidéz y el último adicionando un volumen de agua destilada como control; determinando el número de células viables para construir curvas de crecimiento empleando también el método de viabilidad celular con azul tripan. En el medio que contiene al ácido, el crecimiento celular se inhibe marcadamente y en el medio con agua relativamente ácida el crecimiento se ve un poco reducido. El ácido l-ascórbico es un agente reductor químicamente activo y su actividad antioxidante es responsable de la inhibición del crecimiento de las células en grandes concentraciones.

Taylor P. G. y col. (8), empleando también este tipo de técnicas valoran la actividad del hierro sobre células del sistema inmune, midiendo la respuesta de los linfocitos hacia el mitógeno en ausencia ó presencia del hierro determinando la viabilidad celular con el método de exclusión de azul tripan.

El grado de asociación que hay entre la actividad que experimentalmente, presentan los cultivos celulares, los cultivos de tejidos y la experimentación en tumores; dá la pauta para emplear a los segundos en cernimientos de quimioterapéuticos provenientes de productos naturales, sin embargo existe duda

acerca de su utilidad como bioensayo para la purificación de estos mismos compuestos. Toplin I.(9), presenta una investigación con sistemas conformados con cultivos de tejidos, considerando su papel en el cernimiento primario de la detección de agentes antitumorales y su utilidad como método de bioensayo. Este investigador determina el punto final citotóxico ó la dilución máxima que causa citotoxicidad en forma significativa y punto final letal ó máxima dilución que causa destrucción completa en el cultivo. Entre sus resultados se informa que existe correlación entre la actividad de los compuestos sobre el tejido cultivado y sobre el tumor; dicha correlación no es perfecta por que hay compuestos activos en cultivos de tejidos que son inactivos contra tumores de animales en forma experimental, y compuestos activos para uno ó más sistemas de tumores que son inactivos en cultivos celulares.

En cuanto a las suspensiones celulares, podemos mencionar que estas son usadas también en una amplia gama de estudios que pueden incluir valoración de actividad biológica de compuestos como trombina(10) ó como biotinidasa(11). En ambos casos se emplea sangre humana, de la cuál se forman las suspensiones celulares. Otra forma de empleo de estos métodos es la investi-

gación de compuestos que presentan alguna actividad útil como en el caso de compuestos hemolíticos que son de gran importancia en estudios farmacéuticos. Matsuzaki K. y col. (12), estudia compuestos de tipo lisofosfolípidos por hemólisis celular, considerando que ésta se lleva a cabo en dos pasos; 1) el compuesto actúa con la hemolisina de la membrana y 2) como resultado de lo anterior se presenta una alteración en dicha membrana.

Igualmente Jukna J. J. y Nicholson C. D. (13), estudiaron por medio de suspensiones celulares, la acción de una nueva aquilxantina que presenta efectos sobre la viscosidad de la sangre y sobre la filtrabilidad de suspensiones celulares sanguíneas, efectuando una comparación con otro compuesto del mismo tipo pero con efectos conocidos (pentoxifilina); este nuevo compuesto se empieza a desarrollar para el tratamiento de oclusión arterial vascular que se puede corregir reduciendo la viscosidad sanguínea y aumentando la deformabilidad de las células. Para esta prueba se empleó sangre de rata adicionada del compuesto a probar; para la filtrabilidad se requirió de suspensiones de eritrocitos y leucocitos. Tanto el compuesto nuevo como la pentoxifilina reducen la viscosidad de la

sangre, aunque el compuesto nuevo es más potente.

Tanto los cultivos como las suspensiones celulares representan un buen instrumento de estudio debido a que, como se mencionó anteriormente no intervienen impulsos nerviosos, no hay cambios en la acción biológica del compuesto que se está estudiando, presentan un libre acceso para el compuesto, permiten una población celular homogénea y el uso de medios variables en forma controlada, no son sistemas complejos y se realizan in vitro(5).

En este grupo de Cultivos Celulares, incluimos un método que se realiza en células de papa; específicamente sobre discos de papa, en los cuales se desarrollan tumores producidos por la acción de una bacteria (Agrobacterium tumefaciens), para determinar la actividad antitumoral de extractos de origen natural(14). La clasificación dentro de este grupo es debida a que el medio de experimentación es un cultivo de células, sin importar que estas no sean de origen animal. Este método se realiza tomando en cuenta que la bacteria Agrobacterium tumefaciens, induce en plantas y vegetales daño neoplásico conocido como "corona de hiel"(15)(16); este mal sigue un me-

canismo de tumorigénesis y tanto en plantas como animales tienen en común la incorporación a la célula de ácidos nucleicos extraños(17). Por esta razón se puede anticipar que algunos compuestos con actividad antitumoral inhiben la iniciación y desarrollo del tumor en los sistemas tanto animales como vegetales.

En 1977, el desarrollo de tumores sobre discos de papa(Solanum tuberosum L) se propuso como un sistema ideal para la investigación en el área del cáncer(18) y Galky y col.(19), combinaron estas ideas y demostraron que la inhibición del tumor sobre el disco de papa tiene un paralelismo con un ensayo antitumor llevado a cabo con ratones leucémicos(in vivo) probando compuestos y extractos naturales.

2.2.3).-Otros Ensayos

Existen otra clase de pruebas en las que se utilizan animales inferiores íntegros que no presentan los problemas de manejo de un animal de tamaño mayor ó común, por el tipo de material que emplean pueden clasificarse como pruebas in vivo pero la metodología de la técnica hace que se clasifiquen dentro de las pruebas in vitro; en ellas se valora la actividad biológi

ca de agentes químicos .Dentro de este grupo de ensayos se situa el realizado con Artemia salina Leach,pecueño crustáceo de fácil acceso(20).

2.2.4).-Métodos Microbiológicos

En el presente trabajo se incluyen también técnicas de tipo microbiológico,empleando específicamente hongos.

La Microbiología es el estudio de los microorganismos y sus actividades,forma,estructura,reproducción,fisiología y metabolismo;su distribución en la naturaleza,su relación con otros seres,sus efectos tanto benéficos como perjudiciales que ejercen sobre el hombre y las alteraciones físicas y químicas que llegan a provocar en ese medio ambiente(21).

La mayoría de las veces la microbiología estudia a los organismos microscópicos unicelulares en los cuales todos los procesos vitales se realizan en una célula.Estos microorganismos poseen características que los hacen sujetos ideales para la investigación de procesos biológicos;se pueden cultivar cómodamente en tubos de ensayo,matraces ó cajas petri, ocupando menos espacio y necesitando menos cuidados que los

animales de mayor tamaño. Además se desarrollan rápido y se reproducen a una velocidad muy alta (algunas especies alcanzan 100 generaciones en 24 horas) y sus procesos metabólicos se rigen con las mismas normas que en los animales superiores y plantas.

Los microorganismos presentan susceptibilidad hacia los antibióticos y agentes quimioterapéuticos; esta susceptibilidad y la potencia de los antibióticos se determinan por medio de métodos biológicos ó específicamente microbiológicos. En el caso de la susceptibilidad se emplea la técnica de dilución en tubo ó la de disco en placa; en la primera se determina la cantidad mínima del agente quimioterapéutico necesario para inhibir el desarrollo del microorganismo in vitro, y la técnica de disco en placa se usa comumente para la determinación de la susceptibilidad del microorganismo hacia el agente activo.

En la potencia antibiótica se demuestra la capacidad del antibiótico para matar ó inhibir el desarrollo microbiano, esta potencia se expresa en microorganismos ó unidades determinadas, a partir de la comparación de la acción antibiótica en un

microorganismo de prueba, que causa el compuesto que se prueba; con la que ocasiona una preparación estándar del mismo compuesto(21).

Las técnicas bioautográficas se clasifican dentro de este grupo, ayudando a detectar compuestos con actividad antifúngica y antibacteriana mediante el empleo de placas para cromatografía en capa fina, este método se considera aceptable por su alta sensibilidad. Además de permitir detectar la actividad antibiótica de compuestos puros que se encuentran en mezclas complejas.

Homans A. L. y Fuchs A. (22), realizan esta técnica rociando las placas con una suspensión de esporas de Cladosporium cucumerinum visualizando con anterioridad los sitios de absorción del compuesto con luz U.V.. Lazarovits G. y col. (23), utilizan también una técnica semejante con especies de Fito-micetos, sólo que en esta técnica los sitios de absorción fueron visualizados por inmersión de las placas cromatográficas en una suspensión de carbón de agua.

Peterson A. C. y Edgington L. V. (24), han empleado la misma

técnica aunque rociando las placas con una mezcla de agar y esporas de Penicillium sp., relacionando el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento del hongo con la cantidad de compuesto antifúngico; el método es como en los otros casos sensible y capaz de detectar cantidades de compuesto activo menores a 0.05 ug, además es diez veces más sensible para detectar compuestos activos que cuando se usa luz U.V..

2.3).- Clasificación de Métodos de Cernimiento

Con el objeto de situar los métodos que se han seleccionado, a continuación se da una clasificación de las pruebas biológicas más usuales, la clasificación toma en cuenta las condiciones en que se efectúan las pruebas de acuerdo con los objetivos que se persiguen; aún cuando pueden realizarse diversas clasificaciones, la que se presenta aquí a manera de sugerencia, es una clasificación arbitraria que permite ubicar los ensayos que se realizaron experimentalmente en este trabajo.

En esta clasificación se hace primero una separación entre las pruebas in vivo de las pruebas in vitro; del primer grupo surgen las pruebas en animal completo, y se pueden realizar con una evaluación sobre un sistema orgánico fisiológico

completo o parte de él, esta evaluación puede ser de actividad biológica, de comportamiento y de toxicidad sin olvidar que estas pruebas llegan a presentar una metodología compleja.

Dentro de las pruebas in vitro se encuentran las pruebas en órgano aislado, suspensiones celulares ó cultivos celulares con sus opciones en células eucariotes y procariotes. Aquí también se sitúan aquellas pruebas que se realizan en animales completos; pero que por su manipulación y el tamaño de los organismos empleados son considerados como sujetos de pruebas in vitro. Estas pruebas se mencionan como "Otros ensayos" en este punto también se incluyen las pruebas microbiológicas.

Algunas de estas pruebas son clasificadas clásicamente como Pruebas Farmacológicas, las cuales son de gran utilidad para valorar la actividad biológica de un determinado compuesto sin importar su procedencia, sea natural ó sintética. Ayudando así a que la terapéutica farmacológica pueda transformar una enfermedad fatal en sólo una inconveniencia de la vida(2).

Clasificación de Pruebas Biológicas

de acuerdo a la técnica empleada

-evaluación en
sist. orgánicos

-comportamiento

in vivo -animal completo

-de toxicidad

PRUEBAS BIOLOGICAS

-cultivos celulares

ó

-suspensiones celulares

in vitro

-órgano aislado

-"Otros ensayos"(prueba con
Artemia salina L.)

-métodos microbiológicos

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1).-Bicenoayo con Artemia salina L.(20)

MATERIAL BIOLÓGICO

huevecillos de Artemia salina Leach(Brine Shrimp Eggs
Carolina Biological Supply Company)

COMPUESTOS PARA PRUEBA

extracto de Nectandra salicifolia(fracción metanólica)

carbamacepina

dicloroisoproterenol

teofilina

reserpina

clorpropamida

lactosa

MATERIAL

lámpara

charola de plástico acondicionada como criadero de los
crustáceos

frascos viales de 10 ml

desecador

pipetas graduadas de 10 y 15 ml

pipetas pasteur

caja petri

matraces aforados de 5 y 10 ml

metanol

agua destilada

levadura para panificación

sales para preparar agua de mar(Ocean Instand^R, Aquarium Systems)

PREPARACION DE SOLUCIONES

Agua salina; pesar 38g de sales por cada litro de agua destilada, filtrando la solución antes de su uso.

PREPARACION DE MUESTRAS

Se pesan 50mg de cada compuesto y se disuelven en 5ml de metanol u otro disolvente que disuelva perfectamente las muestras, esta solución es denominada solución A con una concentración de 10mg/ml; de la solución A se toman 0.5ml y se aforan también con 10ml de metanol(solución B con una concentración de 0.5mg/ml). De estas soluciones A y B se toman

los siguientes volúmenes para transferirse en los frascos viales; 10ul de A que corresponden a 100ug/ml, 100ul de la solución B que corresponden a 10 ug/ml y 500ul de solución A que corresponden a la concentración de 1000ug/ml, una vez que se encuentren en los viales, estos se introducen en un desecador conectado al vacío, con el objeto de evaporar las soluciones. Para cada concentración que se trabaja se prepara un control; el cual consiste en los mismos volúmenes que se manejan de las soluciones A y B; pero aquí es sólo metanol. Cada nivel de dosis se realiza tres veces para cada muestra que se prueba, haciendo por triplicado el experimento (nueve repeticiones para cada compuesto).

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Los huevecillos de Artemia salina L. se colocan en una charola que contiene el agua de mar artificial preparada como se indica con anterioridad; el recipiente está provisto de un divisor, de tal forma que se cuente con dos compartimientos comunicados entre sí por uno ó varios orificios esparciendo los huevecillos en uno de los compartimientos y cubriéndolo, sobre el otro se coloca una lámpara con luz directa (70 watts de luz tipo reflector a una distancia aproximada de 30cm) lo

que permite que las larvas de los huevecillos al nacer emigren hacia el compartimiento iluminado, ya que tienen fototropismo positivo. Esto sucede en las condiciones experimentales en un lapso de 72 horas.

PROCEDIMIENTO (Tabla 3.2)

A los frascos viales se les agrega 5ml de agua salina a cada uno. Cuando se cumple el tiempo de incubación de las larvas se colocan 10 larvas en cada frasco vial que contiene ya a la muestra evaporada; esta operación se realiza con la ayuda de una pipeta pasteur contando el número indicado de larvas bajo la luz. Una vez hecho esto se acomodan todos los frascos bajo la luz y se le agraga a cada uno 2 gotas de una solución de levadura como alimento para las larvas. Transcurridas 24 horas, se procede a contar el número de larvas que murieron; para lo cual se vacía el contenido de cada frasco en la mitad de una caja petri, contando las larvas bajo la luz y utilizando un fondo oscuro para facilitar el conteo. Esta operación se efectúa por separado para cada frasco vial. Se elaboran dos experimentos en días distintos.

Se determina el porcentaje de muertes en cada concentración

y en su respectivo control, considerando que sí se presentan muertes en éste, el dato se corrige utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ muertes} = \left(\frac{\text{pruebas-control}}{\text{control}} \right) \times 100$$

Por último se determinan las DL_{50} con un programa basado en análisis de Probits de Finney(25) para datos cuantales, diseñado en la Universidad de Purdue(West Lafayette In.). Los resultados se obtienen en una computadora Hewlett Packard mod.9133 y se recopilan de acuerdo con el siguiente formato.

Registro:

FRACCION:Lactosa FECHA:19/1/1990

DISOLVENTE:metanol

ppm	1000	100	10
-----	------	-----	----

24 horas

No. muertes	4	2	0
	4	2	0
	5	2	0

suma	13	6	0
------	----	---	---

‰ Muertes	43.33	20.0	0
-----------	-------	------	---

DL₅₀ :1308.312 ug/ml

Tabla No.3.1 Formato para recopilación de resultados.

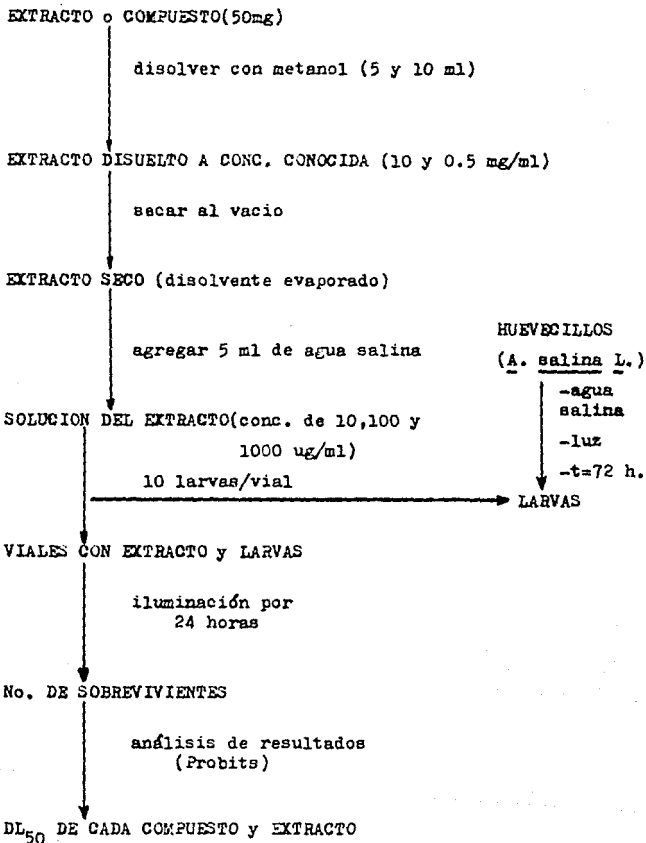


Tabla No.3.2 Método para prueba con Artemia salina L..Diagrama de procedimiento.

3.2).--Ensayo en Disco de Papa para la Evaluación de la
Acción Antitumoral(14)

MATERIAL BIOLÓGICO

cepa de Agrobacterium tumefaciens

EXTRACTOS A PROBAR

Aristolochia grandiflora(fracción hexánica)

Aristolochia taliscana(fracción diclorometano)

Aristolochia grandiflora(fracción etanólica)

Nectandra salicifolia(fracción acetato de etilo)

Nectandra salicifolia(fracción etanólica)

MATERIAL

sacabocados

cortador metálico(cutter)

cajas petri desechables

tubos de ensayo(16x150)

pipetas graduadas de 1 y 2 ml

filtro millipore(0.22 μ m)

solución de hipoclorito de sodio

etanol

agua destilada estéril

dimetilsulfóxido
solución de Lugol
agar
sacarosa
levadura
caldo nutritivo
papa roja
pinzas millipore
matraz erlenmeyer de 1000 ml
pipetas pasteur

EQUIPO

campana de flujo laminar
autoclave
horno
equipo millipore

PREPARACION DE MEDIOS

Caldo Nutritivo :

Pesar 0.5g de peptona, 0.3g de extracto de carne disolviendo en 100ml de agua y esterilizar.

Agar:

Pesar 1.5g de agar para 100ml de agua,esterilizar y llenar cajas.

Medio nutritivo para Agrobacterium tumefaciens:

Pesar 0.8g de caldo nutritivo,0.5g de sacarosa,0.1g de extracto de levadura para 100ml de agua,esterilizando.

PREPARACION DE MUESTRAS

Se disuelven 8mg de cada compuesto en 2ml de dimetilsulfóxido filtrado en equipo millipore,se toman 0.5ml de esta solución más 1.5ml de agua destilada estéril y 2.0ml de solución de cultivo de Agrobacterium tumefaciens.Los controles se preparan con 0.5ml de dimetilsulfóxido más 1.5ml de agua y 2.0ml de solución de cultivo.

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.Cultivo de A. tumefaciens:

Consiste en obtener subcultivos de Agrobacterium tumefaciens de 48 horas haciendo una resiembra de esta bacteria en un tubo con 10ml del medio nutritivo para el desarrollo de la bacteria,una vez hecha la siembra,el tubo se incuba a 28°C. Las cajas petri con el agar se colocan en el refrigerador

hasta su uso.

PROCEDIMIENTO(Tabla 3.3)

Cuando se cumplen las 48 horas de incubación de la bacteria se realiza el siguiente paso de la técnica, que consiste en el corte y obtención de los discos de papa así como la inoculación de estos con los extractos y la bacteria; y por último su incubación. Primero la papa se sumerge en hipoclorito de sodio comercial (cloralax) durante 30 minutos con el fin de asepticar la papa, después se le introduce el sacabocados para obtener un cilindro del cual se obtienen los discos; tomando el cilindro con unas pinzas a la vez de ir cortando un segmento de 0.5cm de ancho aproximadamente, con un cortador metálico (cutter). Tanto el sacabocados como el cortador metálico se asepticizan con etanol pasados por la flama del mechero. Todas las operaciones anteriores se realizan empleando guantes estériles (guantes comerciales para cirugía).

Los discos de papa se colocan, tomándolos con unas pinzas asepticadas, en las cajas petri que contienen ya el agar solidificado (5 discos por caja) y a cada disco se le adiciona una gota del extracto adicionado con la bacteria. Se elaboran

cinco, cajas por cada extracto que se prueba con su respectivo control. El control consiste en adicionar a los discos de papa una gota de una solución compuesta de DMSO, agua destilada estéril y cultivo de la bacteria (de 48 horas). Las cajas con los discos se incuban a temperatura ambiente dentro de una gaveta durante 12 días, después de los cuales se procede a leer resultados contando los tumores desarrollados en cada disco, con la ayuda de una lupa; confirmando después la presencia de estos con una solución reveladora de Lugol. Se realizan dos experimentos en distintos días.

Cabe señalar que todo el material empleado en la técnica se esteriliza antes y después de utilizarlo; y el procedimiento en su mayor parte se realiza en campana de flujo laminar (condiciones estériles).

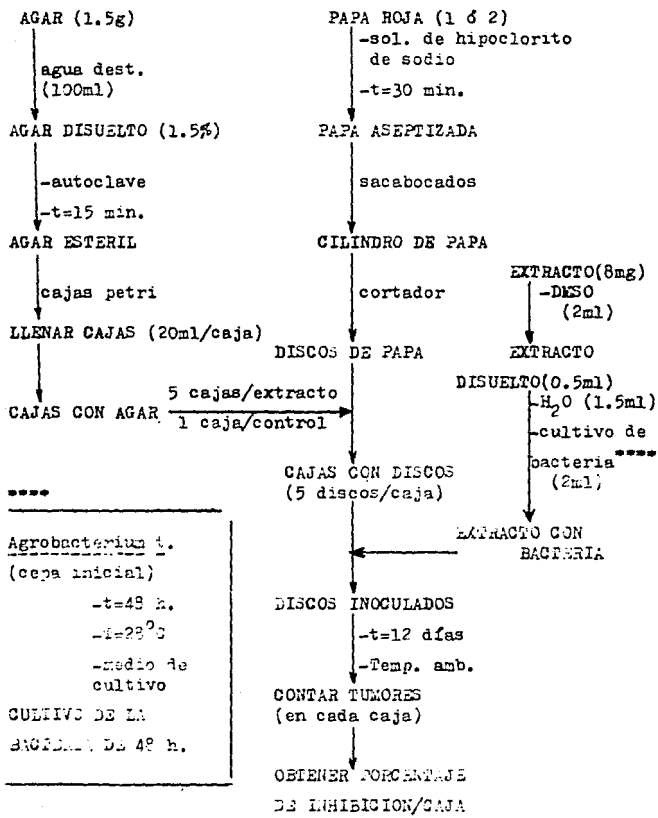


Tabla No.3.3 Ensayo en disco de papa.Seguimiento de la técnica.

3.3).-Método Bioautográfico para valorar Actividad
Antibacteriana ó Antifúngica(24)

MATERIAL BIOLÓGICO

cepas de:Candida albicans

Aspergillus niger

Fusarium sp

COMPUESTOS A PROBAR

Dioscorea mexicana(glucósidos totales)

Dioscorea composita(glucósidos totales)

Dioscorea mexicana(fracción de glucósidos furostánicos)

Acido 4'-metoxi-5-Cl-di-fenil-amino carboxílico

griseofulvina(estándar positivo)

nistatina(estándar positivo)

MATERIAL

placas para cromatografía en capa fina(DC-Alufolien.
Kieselgel 60 F₂₅₄ .MERCK)

capilares

cámaras para cromatografía

placa excavada

cajas petri desechables

pinzas millipore
matraces erlenmeyer de 500 ml
cloroformo
metanol
etanol
agar saboureaud
asa micológica

EQUIPO

campana de flujo laminar
autoclave
horno

PREPARACION DE MEDIOS

Agar Saboureaud:

Pesar 65g de agar saboureaud para 1000ml de agua destilada
y esterilizar.

PREPARACION DE MUESTRAS

Los compuestos se disuelven con anterioridad a su aplicación
en un sistema de disolventes adecuado (cloroformo-metanol

60/40) para Dioscorea mexicana (glucósidos totales) y para la fracción de furostanoles, tanto el ácido 4'-metoxi-5-Cl-difenil-amino carboxílico como la Dioscorea composita (glucósidos totales) y los estándares se disuelven en cloroformo solamente.

PREPARACION DE LAS PLACAS

Primero se cortan las placas para cromatografía en capa fina (de hoja de aluminio) de un tamaño de 4.5x6.0cm, de tal forma que se puedan correr en la misma placa el estándar positivo, el extracto a probar y el control; después de aplicar las soluciones de las sustancias anteriores, las placas se corren en el sistema cloroformo-metanol; 40-60 para Dioscorea mexicana (glucósidos totales) y la fracción de furostanoles, y 80-20 para el ácido 4'-metoxi-5-Cl-difenil-amino carboxílico y Dioscorea composita (glucósidos totales), la griseofulvina y la nistatina eluyen indistintamente en ambos sistemas. Posteriormente las placas se revelan con luz U.V., marcando el sitio en que corre cada componente, por la parte posterior de la placa. En el caso de las placas de Dioscorea mexicana (glucósidos totales) y la fracción de furostanoles, se elaboran placas patrón las cuales se rocían antes de revelarlas con

la luz U.V. con ácido sulfúrico 5 N, este tipo de revelado se realiza con el objeto de ubicar el sitio donde eluye el compuesto en la placa y así poder detectar el sitio de la posible inhibición fúngica en la placa problema. Se realizan tres placas por cada compuesto que se prueba, con tres cajas para cada placa.

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Se colocan 250ml de agar saboureaud ya disuelto en agua; en un matraz y se esteriliza, cuando esté a una temperatura adecuada (35°C aproximadamente) se adicionan cantidades adecuadas (una asada) de las esporas del hongo con la ayuda de una asa micológica; se agita suavemente esta suspensión. Esto se hace con cada cepa de hongos (tres cepas).

PROCEDIMIENTO (Tabla 3.4)

Las placas se colocan en las cajas petri (una placa por caja) y se agrega sobre ellas la suspensión de agar (a una temperatura tal que sea aceptable para la piel de la palma de la mano) con las esporas del hongo a manera de formar una capa delgada sobre la placa. Se deja solidificar el agar y las cajas se incuban a 28°C en ambiente húmedo por un tiempo de

3 a 4 días (se elaboran tres cajas para cada cepa empleada). Después de este tiempo se leen resultados midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento del hongo. Aquí también se hacen dos experimentos en diferentes días.

Con el fin de extrapolar los resultados que se obtienen, se construyen curvas patrón de inhibición con concentraciones conocidas; haciendo una curva para cada compuesto incluyendo a los estándares. Como se ha mencionado con anterioridad todo el procedimiento se realiza por triplicado y en condiciones estériles, el material usado también se esteriliza antes y después de su uso.

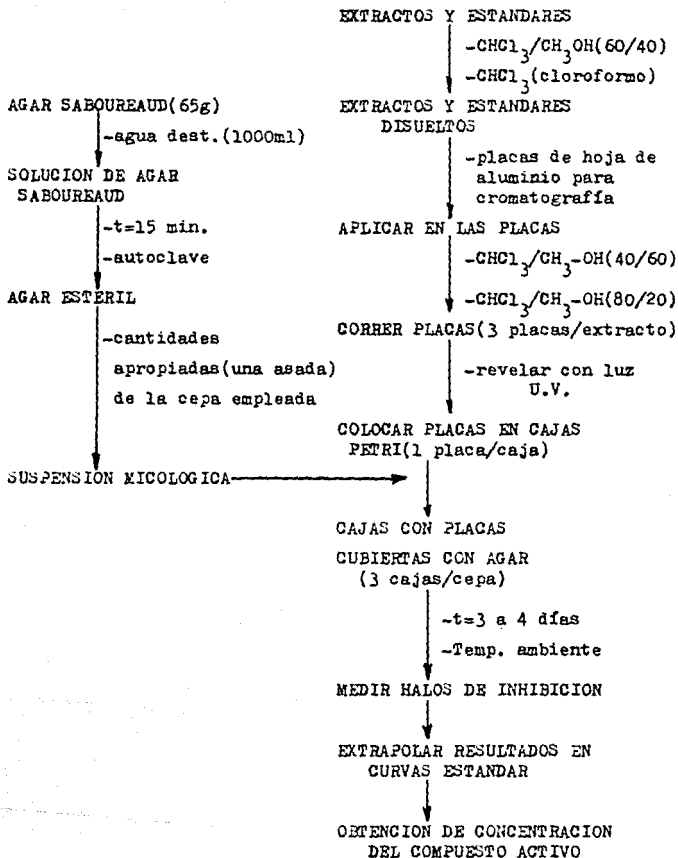


Tabla No.3,4 Método Autobiográfico.Desarrollo de la técnica.

3.4).-Viabilidad en Células Epiteliales; Método de Exclusión
con azul tripan(26)

MATERIAL BIOLÓGICO

linfocitos humanos

COMPUESTOS A PROBAR

Aristolochia grandiflora(fracción hexánica)

Aristolochia grandiflora(fracción etanólica)

Dioscorea mexicana(glucósidos totales)

Dioscorea composita(glucósidos totales)

metotrexato(estándar positivo)

MATERIAL

desecador

frascos viales

micropipetas de 50 y 200 μ l

cámaras de Neubauer

vasos de precipitados de 150 ml

pipeta volumétrica de 1 ml

solución salina isotónica

EQUIPO

microscopio

contador de células

PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución Salina Isotónica:

Pesar 0.85g de cloruro de sodio(NaCl)y disolver en 100ml de agua destilada.

Solución de Azul Tripan:

Pesar 0.1g de azul tripan y disolver en 100ml de solución buffer de fosfatos.

Solución Buffer de Fosfatos:

Pesar 1.3661g de KH_2PO_4 ó NaH_2PO_4 y se aforan a 50ml con agua destilada,ajustando el pH a 7.2;para lo cuál se adiciona 34.7ml de NaOH 1N llevando a un volumen total de 200ml.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se pesan 50mg del extracto ó compuesto y se disuelven ó suspenden en 5ml de solución salina isotónica(sol. A conc. 10mg/ml).

De esta solución se toman 0.5ml y se llevan a 10ml con la misma solución salina(sol. B conc. 0.5mg/ml), posteriormente se toman cantidades adecuadas de estas soluciones para tener tres concentraciones diferentes(1000,100 y 10 ug/ml)tomando 100 y 10ul de A y 20ul de B;se colocan en los frascos viales (3 frascos/cada concentración,con nueve repeticiones en cada compuesto)con su respectivo control que consta de solución salina isotónica.Los viales se meten en un desecador hasta su evaporación total.(según B. N. Meyer et. al.,20).

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Primeramente se toma la muestra de sangre humana de voluntarios sanos;esta muestra se recolecta en un tubo que contenga un anticoagulante,por ejemplo heparina.Después se diluye la sangre con una solución buffer salino de fosfatos y se mezcla, estratificando sobre Ficoll(27)(28);es decir la sangre ya diluida se incorpora sobre un empaque de Ficoll con el fin de hacer una separación de todas las células contenidas en la sangre,y así poder obtener los linfocitos aislados del resto de las células,una vez hecho esto se centrifuga y se recuperan los linfocitos de la interfase,en el tubo donde se hizo la separación celular;los linfocitos se lavan y se centrifu-

gan nuevamente con buffer salino para por último resuspender en solución salina isotónica y de esta forma disponer ya de las células para el ensayo. Cabe aclarar que esta parte de la técnica no se realizó, debido a que el ensayo se empezó a partir de la suspensión de los linfocitos ya separados como se mencionó con anterioridad.

PROCEDIMIENTO (Tabla 3.5)

Se adicionan alicuotas de 1ml de células suspendidas en solución salina isotónica a cada frasco vial con intervalos de 3 a 5 minutos entre cada vial, transcurridos 10 minutos se toma un volumen de 200ul de suspensión celular el cuál se pone en contacto con un volumen de 10ul de colorante azul tripan, después se toman 200ul de esta mezcla y se colocan en la cámara de Newbauer para proceder a contar el número de células vivas y muertas, con la ayuda del microscopio enfocado a 40x y contando sólo las células que se encuentran en los cuatro cuadrantes externos de la cámara; empleando un contador de células manual para facilitar esta operación. Teniendo conocimiento que las células muertas presentan una coloración azul y las vivas no presentan coloración alguna; esto se hace con cada frasco vial en cada compuesto que se prueba. También

se elabora un control al inicio de cada experimento (dos experimentos en distintos días), el cuál consiste en poner en contacto a las células solamente con el colorante y contar las que estén muertas para saber con que población de células no viables se inicia, aún cuando estas no han estado en contacto con ningún compuesto tóxico a ellas.

Los resultados finales se reportan como % de muerte celular en cada nivel de dosis, poniendo interés en aquella que cause el 50% de muertes en la población celular; empleando el porcentaje de células muertas del control, como factor de corrección.

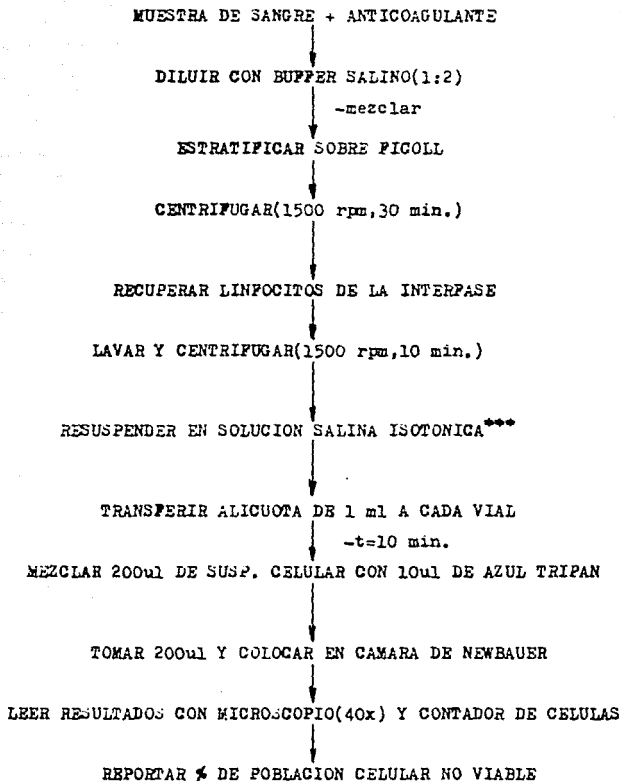


Tabla No.3.3 Desarrollo del procedimiento de Viabilidad Celular con azul tripan,incluyendo obtención de la suspensión celular.

***A partir de este punto se inició el ensayo.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1).--Bioensayo con Artemia salina Leach

En general puede decirse que se trata de un método sumamente sencillo y fácilmente utilizable con propósitos de cernimiento biológico preliminar, presentando como único inconveniente una aparente falta de especificidad.

En cuanto a los resultados experimentales sobre materiales probados; el extracto metanólico de Nectandra salicifolia, muestra una toxicidad bastante elevada; lo que indica la posiblidad de aislar de dicho extracto componentes puros con actividad biológica. En cuanto a la elevada toxicidad que presentan los fármacos empleados para la prueba, estos están de acuerdo con los experimentos que demuestran que Artemia sa-
lina es especialmente sensible a sustancias que tengan actividad sobre sistema nervioso y que sean liposolubles(29).

En principio todos los compuestos y extracto probados mostron alguna actividad sobre el crustáceo, siendo unos más activivos que otros. El extracto de Nectandra salicifolia(fracción

metanólica) tiene una actividad apreciable y los diversos fármacos empleados para la prueba muestran también actividad. La lactosa se utilizó en principio como estándar negativo, sin embargo si presenta alguna actividad tóxica para las larvas de Artemia salina L..DL₅₀ mayor a 1308ug/ml y que para efectos de este ensayo se consideró despreciable.

En forma arbitraria se consideró como activos a los compuestos que presentan una DL₅₀ menor a 1000ug/ml. Los resultados experimentales se encuentran en las tablas No.4.1 y 4.2.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

EXPERIMENTO No.1

COMPUESTO	% de muertes a las 24 hrs.				DL ₅₀ ug/ml	(95% intervalo de confianza)
	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml			
Dicloroiso- proterenol	23	53	97	54	(27-100)	
	20	53	97	60	(32-107)	
	27	50	93	58	(26-114)	
Reserpina	17	47	100	71	(39-122)	
	10	47	100	76	(44-130)	
	20	47	97	69	(36-125)	
Carbamacepina	20	50	87	83	(38-172)	
	17	50	90	83	(42-161)	
	23	43	90	81	(38-167)	
Gloropropamida	13	43	97	88	(50-155)	
	10	40	93	113	(63-200)	
	10	47	97	89	(51-152)	

<u>Nectandra</u>					
<u>salicifolia</u>	3	33	100	131	(82-205)
	7	40	93	123	(71-212)
	0	37	100	131	(85-206)
Teofilina	0	23	77	319	(155-697)
	3	33	70	303	(186-590)
	7	27	73	299	(161-684)

Tabla No.4.1 Determinación del porcentaje de mortalidad, DL_{50} , e intervalos de confianza de diversos compuestos, utilizando Artemia salina L.

EXPERIMENTO No.2

COMPUESTO	% de muertes a las 24 hrs.				DL_{50} ug/ml	(95% intervalo de confianza)
	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml			
<u>Dicloroiso-</u>						
proterenol	23	53	97	54	(27-100)	
	23	57	100	48	(24- 84)	
	23	53	93	59	(28-113)	
Reserpina	17	47	97	75	(45-133)	
	10	47	97	89	(51-152)	
	17	43	100	76	(42-131)	

Carbamacepina	17	53	87	84	(41-169)
	17	50	90	83	(42-161)
	23	43	93	75	(36-145)
Cloropropamida	13	43	97	88	(50-153)
	10	43	93	105	(59-187)
	10	47	100	83	(99-138)
<u>Nectandra</u>					
<u>salicifolia</u>	3	33	100	131	(82-105)
	3	40	97	123	(75-199)
	0	37	97	141	(89-228)
Teofilina	7	23	73	323	(169-750)
	0	23	77	319	(186-590)
	7	33	73	257	(132-590)

Tabla No.4.2 Determinación del porcentaje de mortalidad, DL_{50} , e intervalos de confianza de diversas sustancias, utilizando Artemia salina L..Experimento No.2.

Como se mencionó anteriormente se puede observar que efectivamente el dicloroisoproterenol es el compuesto que presenta mayor actividad al tener la DL_{50} de menor magnitud, le siguen reserpina, carbamazepina, cloropropamida, el extracto de Nectandra salicifolia, teofilina y por último lactosa, que presenta una actividad dada como DL_{50} mayor a 1000ug/ml. Todos presentan actividad en los tres niveles de concentración a excepción de la lactosa para la cuál no hay muerte de los crustáceos, aún en la concentración más baja (10ug/ml). La teofilina y el extracto de Nectandra salicifolia presentan también una baja mortalidad a dosis de 10ug/ml. En el caso de Nectandra salicifolia la toxicidad aumenta con la concentración, obteniéndose finalmente una DL_{50} baja (135 ppm) indicando con ello una actividad relativamente elevada.

Como es de esperarse el número de muertes se incrementa proporcionalmente conforme aumenta la concentración del compuesto activo. Los ensayos realizados en diferentes días, permiten apreciar la reproducibilidad del método ya que los resultados varían un poco entre sí. Este bioensayo se puede considerar de una reproducibilidad aceptable, basando este criterio en los intervalos de confianza obtenidos para cada sustancia

probada en ambos experimentos.

En el método original el tiempo de incubación para las larvas es de 24 horas; en nuestras condiciones se encontró que a las 24 horas se producen pocas larvas, por lo que se modificó el tiempo de incubación a 48 horas, para poder disponer de larvas en mayor cantidad y de aspecto uniforme. Por otro lado puede emplearse cualquier disolvente para disolver los compuestos a ensayar, siempre y cuando sea posible evaporarlo por completo antes de adicionar las larvas; de tal manera que no afecte la vida de los crustáceos, para comprobar lo anterior se corre siempre y en forma paralela un blanco con el disolvente utilizado; en este caso se usó metanol el cuál no interfirió en los resultados que se obtuvieron.

4.2).-Ensayo en Disco de Papa para la Evaluación de la Acción Antitumoral

Como comentario general del método, puede decirse que se trata de un método simple aunque laborioso que se puede realizar con un mínimo de equipo, y utilizando cantidades mínimas de muestra (8mg). Esta técnica permite detectar compuestos ó extractos activos de manera fácil y barata; y las sustancias activas pueden ser probadas posteriormente con animales de experimentación. Como notas adicionales al método debe apuntarse lo siguiente: para facilitar la preparación de los discos de papa, al obtener el cilindro del cuál se obtienen los discos, este debe ser de mayor longitud que la papa para lo cuál se requiere de un sacabocados apropiado. Y no deben de transcurrir más de 30 minutos entre el corte de la papa y la inoculación de los discos de papa con la mezcla de extracto, bacteria y disolvente.

Como se mencionó en la parte teórica los resultados finales se reportan en % de inhibición de los tumores generados por Agrobacterium tumefaciens sobre tejido de papa; para ello:

- 1) se cuentan los tumores en cada disco de papa (5 discos en cada caja) por caja, incluyendo a los controles. Reportando el

número de tumores por disco y por caja con su respectivo control,

2) se obtiene el promedio del número de tumores tanto de los discos controles, así como de los discos de cada extracto que se prueba para cada caja (5 cajas por extracto más su respectivo control),

3) por último se calcula el porcentaje de inhibición de los tumores en cada caja, obteniéndose como resultado final el promedio de este porcentaje para cada extracto (5 extractos).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

EXPERIMENTO No.1

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	21	22	20	20	19
2	20	21	20	19	22
3	20	19	19	20	18
4	22	20	19	21	21
5	21	21	22	20	19
CON- TROL	30	29	28	28	29

EXPERIMENTO No.2

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	21	21	18	17	18
2	20	19	18	18	19
3	20	21	20	18	18
4	19	20	16	17	18
5	20	20	19	17	20
CON- TROL	29	29	30	28	28

Tabla No.4.3 Número de tumores por disco y por caja para Aristolochia taliscana (fracción de diclorometano).

EXPERIMENTO No.1

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	21	21	20	21	20
2	20	19	19	19	20
3	20	20	19	21	19
4	20	19	21	19	21
5	20	19	20	19	19
CON- TROL	30	29	29	28	29

EXPERIMENTO No.2

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	20	21	21	20	21
2	20	19	20	19	20
3	20	21	19	20	19
4	20	19	21	20	21
5	20	19	20	19	20
CON- TROL	29	30	29	28	29

Tabla No.4.4 Número de tumores por disco y por caja correspondientes a Aristolochia grandiflora(fracción hexánica).

EXPERIMENTO No.1

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	20	21	20	22	23
2	21	21	23	22	22
3	20	22	22	21	20
4	22	23	23	21	22
5	22	22	23	23	21
CON- TROL	30	30	31	29	30

EXPERIMENTO No.2

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	21	20	22	23	21
2	21	21	22	22	22
3	20	21	22	22	21
4	23	23	21	22	22
5	22	21	23	23	22
CON- TROL	30	31	30	30	30

Tabla No.4.5 Número de tumores por disco y por caja de Aristolochia grandiflora(fracción etanólica).

EXPERIMENTO No.1

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	23	25	27	26	23
2	25	27	28	23	25
3	26	26	27	28	26
4	17	15	14	14	20
5	20	21	19	20	19
CON- TROL	30	31	30	32	29

EXPERIMENTO No.2

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	24	25	25	26	26
2	25	25	26	26	28
3	25	25	26	27	25
4	26	25	27	27	25
5	26	26	28	27	26
CON- TROL	29	31	30	29	30

Tabla No.4.6 Número de tumores por disco y por caja de Nectandra salicifolia(fracción etanólica).

EXPERIMENTO No.1

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	25	26	26	27	26
2	27	28	26	28	27
3	27	25	26	25	25
4	25	25	27	27	26
5	26	26	27	28	26
CON- TROL	30	30	30	29	29

EXPERIMENTO No.2

No. CAJA	D E T U M O R E S				
	D	I	S	C	O
	1	2	3	4	5
1	24	25	26	23	26
2	27	28	25	23	25
3	25	26	28	28	26
4	26	25	26	27	25
5	27	26	25	26	26
CON- TROL	32	30	31	29	30

Tabla No.4.7 Número de tumores por disco y por caja de Nectandra salicifolia(fracción acetato de etilo).

EXPERIMENTO No.1

EXTRACTO	PROMEDIO DE TUMORES EN LAS CAJAS CONTROL (disolv.+agua+bact.)	PROMEDIO DEL No. DE TUMORES/DISCO EN CADA CAJA				
		C	A	J	A	S
<u>Aristolochia taliscana</u> (fracción CH ₂ Cl ₂)	28	20	20	19	21	21
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción hexánica)	29	21	19	20	20	19
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción etanólica)	30	21	22	21	22	22
<u>Nectandra salicifolia</u> (fracción etanólica)	30	25	26	27	16	20
<u>Nectandra salicifolia</u> (fracción acet. de etilo)	30	26	27	26	26	27

Tabla No.4.8 Promedio del número de tumores registrados en las cajas control y en las cajas de los extractos probados. Este promedio se obtiene por disco.

EXPERIMENTO No.2

EXTRACTO	PROMEDIO DE TUMORES EN LAS CAJAS CONTROL (disolv.+agua+bact.)	PROMEDIO DEL No. DE TUMORES/DISCO EN CADA CAJA				
		C	A	J	A	S
<u>Aristolochia taliscana</u> (fracción CH ₂ Cl ₂)	29	19	19	19	19	19
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción hexánica)	29	21	20	20	20	20

<u>Aristolochia grandiflora</u>	30	21	22	21	22	22
(fracción etanólica)						
<u>Nectandra salicifolia</u>	30	25	26	26	26	27
(fracción etanólica)						
<u>Nectandra salicifolia</u>	30	25	26	27	26	26
(fracción acet. de etilo)						

Tabla No.4.9 Promedio del número de tumores por disco en las cajas control y en las cajas de los extractos probados.

Cabe aclarar en este punto, que una vez que se obtienen los promedios del número de tumores, tanto en los controles como en los extractos; se procede a obtener el % de inhibición de cada extracto activo, considerando el valor promedio del control como un 100% de tumoración. Por ejemplo en el caso del extracto de Aristolochia taliscana (fracción de diclorometano) el valor promedio de tumores de su control es de 29, el cuál corresponde al 100% de tumores desarrollados, una vez establecido esto se empieza a trabajar con el valor promedio de la caja No.1 el cuál es de 19 tumores desarrollados, y por proporción simple se obtiene el porcentaje al que corresponden los 19 tumores que es de 71.4%; este valor es restado a 100% para obtener el porcentaje de inhibición del extracto que

es de 28.6%. De esta forma se van calculando los porcentajes de inhibición para caja y para cada extracto (cinco cajas por extracto).

EXPERIMENTO No.1

EXTRACTO	% DE INHIBICION/CAJA					PROMEDIO
	C	A	J	A	S	
	1	2	3	4	5	
<u>Aristolochia taliscana</u> (fracción CH ₂ Cl ₂)	28.6	28.6	32.1	25.0	25.0	28.0
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción hexánica)	27.6	34.5	31.0	31.0	34.5	31.7
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción etanólica)	30.0	26.7	30.0	26.7	26.7	28.0
<u>Nectandra salicifolia</u> (fracción etanólica)	16.7	13.0	10.0	46.7	33.0	23.9
<u>Nectandra salicifolia</u> (fracción acet. de etilo)	13.0	10.0	13.0	13.0	10.0	11.8

Tabla No.4.10 Porcentaje de inhibición de los extractos probados, registrado en cada caja con el valor promedio correspondiente.

EXPERIMENTO No.2

EXTRACTO	% DE INHIBICION/CAJA					PROMEDIO
	C	A	J	A	S	
	1	2	3	4	5	
<u>Aristolochia taliscana</u> (fracción CH ₂ Cl ₂)	34.5	34.5	34.5	34.5	34.5	34.5
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción hexánica)	27.6	31.0	31.0	31.0	31.0	30.3
<u>Aristolochia grandiflora</u> (fracción etanólica)	30.0	26.7	30.0	26.7	26.7	28.0
<u>Nectandra salicifolia</u> (fracción etanólica)	16.7	13.0	13.0	13.0	10.0	13.1
<u>Nectandra salicifolia</u> (fracción acet. de etilo)	16.7	13.0	10.0	13.0	13.0	13.1

Tabla No.4.11 Porcentaje de inhibición en cada caja con su respectivo promedio.

Según Ferrigni N. R. y col.(14),se considera que aquellas sustancias que presentan un porcentaje de inhibición mayor al 20%,poseen una actividad significativa.De acuerdo con este criterio ;todos los extractos de Aristolochia tienen una actividad inhibitoria,lo cuál está de acuerdo con el uso

popular que se dá a las plantas de este género; en cambio el extracto de Nectandra salicifolia (fracción etanólica y de acetato de etilo) no se puede discernir por el momento si es activo ó no, ya que presenta mucha diferencia entre el valor promedio del porcentaje de inhibición del experimento No.1 al experimento No.2.

El extracto que presentó mayor porcentaje de inhibición en forma constante en ambos experimentos es el de Aristolochia grandiflora (fracción hexánica) con un valor de 28%; ya que el Aristolochia taliscana (fracción de diclorometano) varía de un experimento a otro, siendo mayor en el segundo (34.5% de inhibición).

Por otro lado las células tumorales carecen de almidón por lo que al adicionar la solución de Lugol como prueba confirmativa, estas quedan incoloras ya que no toman la coloración azul característica de almidón con yodo.

ANALISIS ESTADISTICO

Con el fin de poder determinar si las técnicas realizadas tienen reproducibilidad, se realizaron análisis de varianza

a cada una de las técnicas (con excepción del bioensayo con Artemia salina L.), estos análisis se efectuaron con un programa estadístico llamado ANOVA (de una vía) el cual pertenece a un paquete denominado Number Cruncher Statistical System, que realizó el Dr. Jerry L. Hintze (Kaysville, Utah 1984).

En este análisis se compararon los resultados del experimento No.1 con el experimento No.2 en cada técnica, obteniendo una tabla del análisis de varianza y otra de medias y errores.

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	1.936	1.936	0.02	0.880
Dentro gpos.	8	641.188	80.1485		
TOTAL	9	643.124			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	24.68	4.003711
	2	23.80	4.003711

En base a los resultados anteriores; el método presenta una probabilidad menor a uno ($p < 1$) y ambos experimentos tienen el mismo error estándar (4.003711), lo cual determina que la técnica es reproducible.

4.3).-Método Autobiográfico para Valorar Actividad Antibacteriana ó Antifúngica empleando Cromatografía en Capa Fina

La técnica es muy sencilla y tanto el material como el equipo que se requiere para su elaboración son pocos costosos; además de que se puede desarrollar con cantidades mínimas de muestra (la suficiente para correr una placa cromatográfica) y en lugares que no necesitan algún acondicionamiento especial. Estas mismas características se han presentado también en las anteriores técnicas, lo cuál indica que de alguna forma se cumple el objetivo de este trabajo (técnicas con metodología simple).

En este método se registra como resultado inicial el diámetro de inhibición que presenta el desarrollo del microorganismo por efecto del compuesto que se está probando. Obteniéndose un valor promedio de esta inhibición para cada extracto activo con cada una de las cepas empleadas; el mismo procedimiento se realiza con los estándares. El resultado final se registra como promedio total de los milímetros de inhibición; con un sólo valor de inhibición para cada compuesto y para los estándares, ya que este valor se extrapolará en curvas estándar de cada compuesto con el fin de conocer la concentración

exacta de la sustancia, que está inhibiendo el desarrollo del microorganismo. Sobre Fusarium sp no presentan actividad de inhibición ni los compuestos que se probarón ni los estándares; sin embargo con Aspergillus niger, los compuestos para prueba no inhibieron pero los patrones griseofulvina y nistatina tuvieron alguna actividad. Por esta razón sólo se siguen trabajando los resultados obtenidos de los cuatro compuestos con la cepa de Candida albicans y con los patrones de griseofulvina y nistatina.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

CEPA: Candida albicans

ESTANDAR POSITIVO: Griseofulvina

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	EXPERIMENTO No.1						EXPERIMENTO No.2					
	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	11	15	10	15	10	15	10	14	10	14	11	15
2	10	15	11	15	10	16	10	14	10	14	11	14
3	11	14	11	15	10	14	11	15	10	15	11	15

Tabla No.4.12 Registro de los diámetros de inhibición del estándar y de Dioscorea mex. (glucósidos totales) en dos experimentos distintos con nueve repeticiones para cada sustancia.

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	EXPERIMENTO No.1						EXPERIMENTO No.2					
	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	12	15	12	14	12	15	12	14	12	14	11	14
2	11	14	11	14	12	14	11	15	12	16	12	15
3	11	14	11	15	10	15	12	15	12	15	11	15

Tabla No.4.13 Registro de los diámetros de inhibición para estándar y muestra (furostanoles de Dioscorea mex.) en dos experimentos diferentes con nueve repeticiones cada uno.

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	EXPERIMENTO No.1						EXPERIMENTO No.2					
	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	NI	16	NI	15	NI	15	NI	15	NI	14	NI	15
2	NI	15	NI	15	NI	16	NI	14	NI	15	NI	15
3	NI	15	NI	15	NI	15	NI	15	NI	15	NI	14

Tabla No.4.14 Registro de los diámetros de inhibición del ácido 4'-metoxi-5-Cl-difenil-amino carboxílico y del estándar, en ambos experimentos.

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	NI	14	NI	15	NI	15	NI	14	NI	15	NI	14
2	NI	15	NI	15	NI	14	NI	14	NI	15	NI	15
3	NI	15	NI	15	NI	15	NI	15	NI	15	NI	15

Tabla No.4.15 Registro de los diámetros de inhibición para Dioscorea composita(glucósidos totales)y para el estándar en ambos experimentos.

CEPA:Candida albicans

ESTANDAR POSITIVO:Nistatina

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
1	11	28	11	28	10	28	11	30	11	30	10	30
2	11	28	11	28	10	27	11	28	10	28	11	29
3	10	27	11	27	11	27	11	31	11	30	10	30

Tabla No.4.16 Diámetros de inhibición para glucósidos totales (Dioscorea mexicana)con nistatina como estándar positivo en dos experimentos diferentes.

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	12	28	12	28	11	27	11	28	11	28	12	28
2	12	28	12	27	12	28	12	28	11	28	12	27
3	11	26	12	26	11	27	11	27	11	27	11	27

Tabla No.4.17 Diámetros de inhibición para Furostanoles
(Dioscorea mexicana) usando nistatina como estándar.

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	NI	28	NI	27	NI	27	NI	28	NI	28	NI	27
2	NI	27	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28
3	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28

Tabla No.4.18 Diámetros de inhibición para el ácido 4'-metoxi-
5-Cl-difenil-amino carboxílico, usando nistatina como estándar.

DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

PLACA	1	st	2	st	3	st	1	st	2	st	3	st
CAJA												
1	NI	28	NI	28	NI	27	NI	28	NI	28	NI	28
2	NI	27	NI	27	NI	28	NI	27	NI	28	NI	28
3	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28	NI	28

Tabla No.4.19 Diámetros de inhibición de Dioscorea composita (glucósidos totales) y nistatina como estándar, para ambos experimentos.

Se puede observar que, además de los dos estándares solamente Dioscorea mexicana (glucósidos totales) y la fracción de Furostanoles (también de Dioscorea mex.) presentaron inhibición en ambos experimentos frente a la cepa de Candida albicans. El ácido 4'-metoxi-5-Cl-difenil-amino carboxílico y Dioscorea composita (glucósidos totales) no presentaron inhibición.

Como ya se mencionó anteriormente, el siguiente paso es obtener los valores promedio de los diámetros de inhibición.

CEPA: Candida albicans

ESTANDAR POSITIVO: Griseofulvina

EXPERIMENTO No.1

C	A	J	A	PROMEDIO DEL DIAMETRO DE INHIBICION/CAJA(mm)					
				1	st	2	st	3	st
COMPUESTO									
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)				10	15	10	15	11	14
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos furostánicos)				12	15	11	14	11	14

EXPERIMENTO No.2

COMPUESTO

<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)				10	14	10	14	11	15
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos furostánicos)				12	14	12	15	12	15

Tabla No.4.20 Promedio de los diámetros de inhibición correspondientes a dos experimentos diferentes, con griseofulvina como estándar.

ESTANDAR POSITIVO: Nistatina

EXPERIMENTO No.1

C	A	J	A	PROMEDIO DEL DIAMETRO DE INHIBICION/CAJA(mm)					
				1	st	2	st	3	st
COMPUESTO									
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)				11	28	11	28	11	27
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos furostánicos)				12	28	12	28	11	26

EXPERIMENTO No.2

COMPUESTO

<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)				11	30	11	28	11	30
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos furostánicos)				11	28	12	28	11	27

Tabla No.4.21 Promedio de los diámetros de inhibición empleado nistatina como estándar.

CEPA; Candida albicans

ESTANDAR POSITIVO: Griseofulvina

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

PROMEDIO TOTAL DEL DIAMETRO DE INHIBICION(mm)

COMPUESTO	st		st	
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)	10	15	10	14
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos furostánicos)	11	14	12	15

Tabla No.4.22 Promedio total del diámetro de inhibición, tanto del estándar como de los compuestos (resultado final).

ESTANDAR POSITIVO: Nistatina

EXPERIMENTO No.1

EXPERIMENTO No.2

PROMEDIO TOTAL DEL DIAMETRO DE INHIBICION(mm)

COMPUESTO	st		st	
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)	11	28	11	30
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos furostánicos)	12	27	11	28

Tabla No.4.23 Registro del promedio total del diámetro de inhibición, con nistatina como estándar (resultado final).

Los valores que presenta el extracto de Dioscorea mexicana en sus fracciones glucósidos totales y furostánicos, no varían en forma significativa de un experimento a otro sin importar el estándar que se esté empleando (griseofulvina ó nistatina). En el caso de los estándares; estos tampoco presentan diferencias significativas en sus diámetros de inhibición, de un experimento a otro.

Con estos resultados se observa que la fracción de furostanoles de Dioscorea mexicana puede ser ligeramente más activa; ya que sus diámetros de inhibición son un poco mayores que los de Dioscorea mexicana (glucósidos totales). Estos resultados como se mencionó con anterioridad, se extrapolan en curvas estándar de cada compuesto.

4.3.1).-Construcción de las Curvas Estándar

Estas curvas se realizan con concentraciones conocidas de cada sustancia, trabajando ocho concentraciones distintas (de 0.06 a 1.00ug/ml); por lo tanto se elaboran cuatro curvas en total, en las cuales se extrapolan los resultados finales de los diámetros de inhibición con el objeto de conocer la concentración a la cuál se presenta la actividad del compuesto

CEPA: Candida albicans

COMPUESTO: Dioscorea mexicana

CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	Glucósidos totales			Glucósidos furostánicos		
	CURVA			ESTANDAR		
	inhibición (mm)			inhibición (mm)		
0.06	1	1	1	1	1	1
0.08	1	2	1	2	1	1
0.10	2	1	1	2	2	2
0.20	3	4	3	4	4	3
0.40	7	6	7	7	7	8
0.60	11	11	10	12	11	11
0.80	14	14	14	15	15	15
1.00	16	17	17	19	18	19

Tabla No.4.24 Valores para las curvas patrón de ambas sustancias de prueba.

COMPUESTO: Griseofulvina

Nistatina

CONC. ($\mu\text{g/ml}$)	CURVA			ESTANDAR		
	inhibición (mm)			inhibición (mm)		
0.06	2	1	2	3	2	3
0.08	2	2	2	4	4	3
0.10	2	3	3	5	4	5
0.20	5	4	5	9	10	10
0.40	10	10	9	19	19	18

0.60	15	15	14	28	28	28
0.80	20	19	19	38	37	38
1.00	24	25	24	46	47	47

Tabla No.4.25 Diámetros de inhibición para concentraciones conocidas de ambos compuestos estándar. De estos valores y los de la tabla anterior, se obtiene un valor promedio de cada concentración en cada compuesto, para elaborar la curva de cada uno.

CEPA: Candida albicans

PROMEDIO DEL DIAMETRO DE INHIBICION (mm)

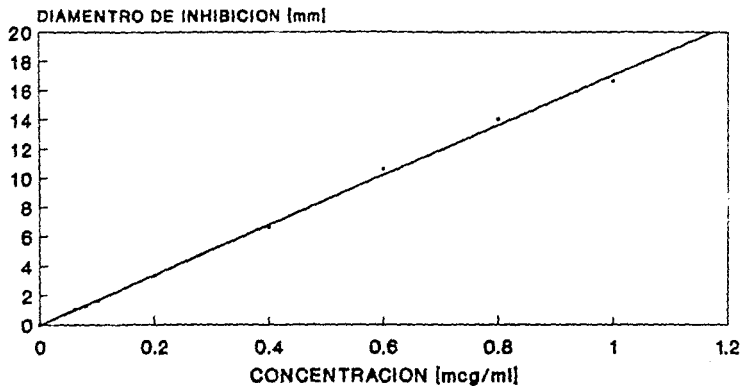
COMPUESTO CONC. (µg/ml)	Glucósidos		Griseofulvina	Nistatina
	totales	furostánicos		
0.06	1.0	1.0	1.6	2.6
0.08	1.3	1.3	2.0	3.6
0.10	1.6	2.0	2.6	4.6
0.20	3.3	3.6	4.6	9.6
0.40	6.6	7.3	9.6	18.6
0.60	10.6	11.3	14.6	28.0
0.80	14.0	15.0	19.3	37.6
1.00	16.6	18.6	24.3	46.6

Tabla No.4.26 Promedio de los diámetros de inhibición de los cuatro compuestos para la elaboración de las curvas estándar de cada uno.

CURVA ESTANDAR DE INHIBICION

Discorea mexicana

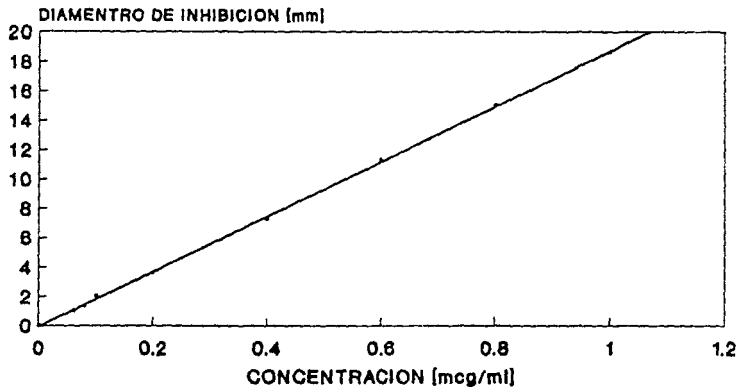
(Glucosidos totales)



EST. PSIC.
SALV. DE LA
UNIVERSIDAD
DE GUATEMALA

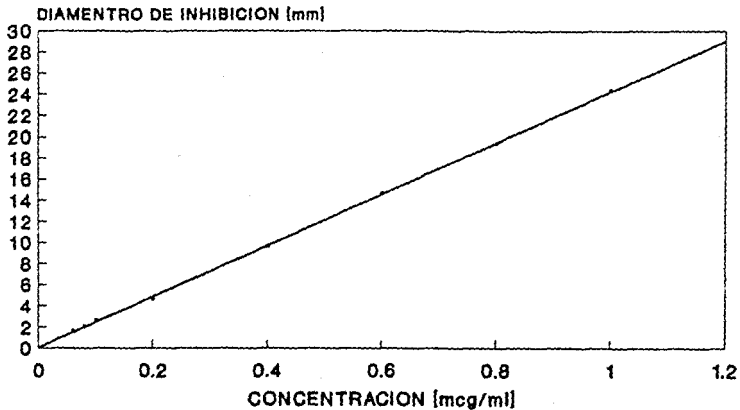
CURVA ESTANDAR DE INHIBICION

Discorea mexicana
(Glucosidos furostanicos)



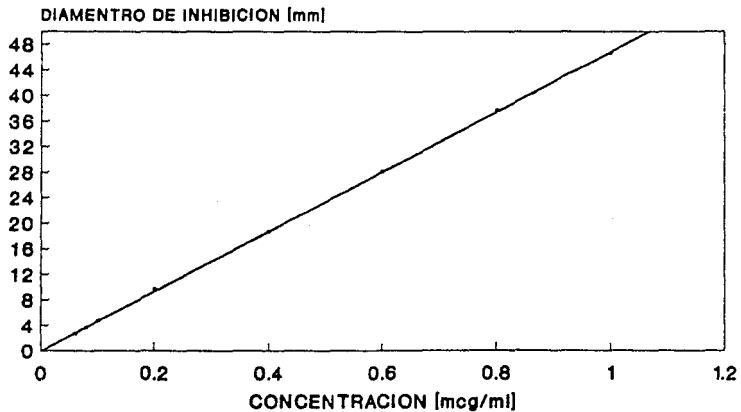
CURVA ESTANDAR DE INHIBICION

Griseofulvina



CURVA ESTANDAR DE INHIBICION

Nistatina



Como se puede observar en las cuatro gráficas, se presenta una relación directamente proporcional entre ambos parámetros ya que a mayor concentración del compuesto, mayor diámetro de inhibición; esta relación se presenta en forma de línea recta con pendiente positiva y ordenada al origen aproximadamente.

Al extrapolar los diámetros de inhibición que presentarán Dioscorea mexicana (glucósidos totales y la fracción de furostanoles) como compuestos de prueba; y de griseofulvina y nistatina como compuestos estándar (cada compuesto en su curva correspondiente), se puede conocer cuál es la concentración que está produciendo la inhibición sobre el desarrollo del hongo (Candida albicans). Por lo tanto la fracción de glucósidos furostánicos tiene más poder de inhibición que los glucósidos totales, debido a que para un diámetro de inhibición igual a 11 mm la fracción de furostanoles requiere de 0.50 ug/ml y los glucósidos totales necesitan una concentración de 0.66ug/ml. En el caso de los compuestos estándar, nistatina es más potente que griseofulvina, debido a que en una inhibición de 28 mm de diámetro; nistatina la efectúa con una concentración de 0.60ug/ml mientras que griseofulvina necesita una concentración de 1.156ug/ml.

COMPUESTO	DIAMETRO DE INHIBICION (mm)	CONCENTRACION (ug/ml)
<u>Dioscorea mexicana</u>	10	0.60
(gluc. totales)	11	0.66
Furostanoles	11	0.59
	12	0.645
Griseofulvina	14	0.575
	15	0.615
Nistatina	27	0.58
	28	0.60
	30	0.645

Tabla No.4.27 Concentraciones correspondientes a cada compuesto, obtenidas de las gráficas por extrapolación de los diámetros de inhibición presentados por cada compuesto.

Por medio de las gráficas también se puede determinar la actividad a la concentración de 0.04ug/ml, y de esta forma confirmar lo que citan Peterson C. A. y Edgington L. V. (23), referente a que este método es capaz de detectar cantidades menores a 0.05 ug de compuesto activo, lo cuál denota sensibilidad.

ANALISIS DE VARIANZA

ESTANDAR POSITIVO:Griseofulvina

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	0.125	0.125	0.02	0.883
Dentro gpos.	6	31.750	5.2916		
TOTAL	7	31.875			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	12.5	1.150181
	2	12.75	1.150181

ESTANDAR POSITIVO:Nistatina

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	0.5	0.5	0.01	0.945
Dentro gpos.	6	583.0	97.1666		
TOTAL	7	583.5			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	19.5	4.928658
	2	20.0	4.928658

Aquí se realizó un análisis estadístico para los experimentos donde se usó griseofulvina como estándar, y otro en los que se empleó nistatina como estándar. En ambos las probabilidades fueron menores a uno y los errores estándar se presentan iguales de un experimento a otro, dentro del mismo análisis; por lo tanto el método llega a ser reproducible.

4.4).-Viabilidad Celular en Células Epiteliales;Método de Exclusión con Azul Tripan

En general la técnica es sencilla en cuanto a su elaboración, y tanto el material como el equipo que requiere es mínimo; aunque la separación de los linfocitos es un poco más complicada y laboriosa, pero teniendo un proveedor que nos proporcione las células cada vez que se empleen la técnica se hace más simple.

En este método se obtienen los resultados contando primero el número de células vivas y muertas en cada frasco vial (nueve repeticiones/compuesto probado y por nivel de dosis). Y como se mencionó en el punto 3.4 de la parte experimental, las células se cuentan en los cuadrantes externos de la cámara de Newbauer, y sólo aquellas que se tiñen de color azul son consideradas muertas y las incoloras son las vivas.

Posteriormente se obtiene la suma de todas las células muertas en cada repetición hecha, para posteriormente obtener el porcentaje de células muertas considerando a la población total de células(vivas y muertas) como el 100%; a este porcentaje que se obtiene de acuerdo con el número de células no

viables que se cuentan, se le resta el factor de corrección el cuál corresponde al porcentaje de células muertas determinado en la prueba control (contar la población celular sin que esté en contacto con ningún compuesto, sólo con solución salina y el colorante) que se hace antes de agregar las células a los frascos viales. Como en las otras técnicas aquí también se realizaron dos experimentos en diferentes días.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

EXPERIMENTO No.1

M=No. de células muertas

CONTROL: No. TOTAL DE CELULAS=69(100%)

66 células vivas(95.65%)

3 células muertas(4.35%)

DOSIS COMPUESTO	10 ug/ml			100 ug/ml			1000 ug/ml		
	M			M			M		
<u>Aristolochia g.</u>	5	3	2	19	15	8	16	16	11
(fracción hexánica)	1	6	6	18	10	11	10	15	20
-	4	4	5	20	30	21	24	30	33
DE UN TOTAL INICIAL=	167			279			239		
<u>Aristolochia g.</u>	5	5	6	14	13	13	26	36	42
(fracción etanólica)	10	5	7	15	17	19	56	60	25
	8	5	15	8	27	12	18	32	30
DE UN TOTAL INICIAL=	250			244			372		
<u>Dioscorea mexicana</u>	20	22	21	33	44	45	34	24	36
(gluc. totales)	15	27	25	29	34	12	40	46	16
	26	20	18	26	41	28	8	28	15
DE UN TOTAL INICIAL=	523			479			313		
<u>Dioscorea composita</u>	19	19	15	18	18	20	25	35	21
(gluc. totales)	20	9	6	22	27	33	37	18	10
	12	17	15	42	16	25	15	39	40
DE UN TOTAL INICIAL=	542			422			333		

Metotrexato	10	10	18	30	30	31	28	28	45
	20	23	10	21	31	33	28	42	19
	21	12	15	31	19	17	23	21	23
DE UN TOTAL INICIAL=	302			377			275		

EXPERIMENTO No.2

CONTROL: No. TOTAL DE CELULAS=239(100%)

216 células vivas(90.38%)

23 células muertas(9.62%)

DOSIS	10 ug/ml			100 ug/ml			1000 ug/ml		
COMPUESTO	M			M			K		
<u>Aristolochia g.</u>	30	10	18	65	70	90	60	50	95
(fracción hexánica)	22	8	41	55	40	81	62	49	73
	30	31	30	63	60	65	81	68	62
DE UN TOTAL INICIAL=	821			885			760		
<u>Aristolochia g.</u>	11	10	25	34	16	14	39	24	32
(fracción etanólica)	32	60	65	18	15	26	46	53	42
	50	1	8	24	16	46	29	30	49
DE UN TOTAL INICIAL=	667			339			398		
<u>Dioscorea mexicana</u>	9	16	10	61	71	49	49	45	54
(gluc. totales)	21	33	30	53	59	94	62	77	98
	9	24	40	73	88	51	78	40	76
DE UN TOTAL INICIAL=	465			643			692		

<u>Dioscorea composita</u>	5	19	2	59	50	26	27	38	24
(gluc. totales)	23	29	42	31	70	94	36	74	53
	42	5	10	33	19	66	32	35	40
DE UN TOTAL INICIAL=	596			760			451		
Metotrexato	8	11	4	39	48	75	38	38	50
	16	22	38	82	22	17	51	70	37
	39	7	2	22	17	42	42	85	79
DE UN TOTAL INICIAL=	291			517			493		

Tabla No.4.28 Número de células muertas por cada nivel de dosis, en cada experimento(dos).

A continuación se obtiene la suma de estas células muertas en cada nivel de dosis y para cada compuesto que se está probando. Con estos resultados se determina el porcentaje de células muertas ó no viables; considerando al total como el 100%.

EXPERIMENTO No.1

DOSES	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml
COMPUESTO	M	M	M
<u>Aristolochia g.</u> (fracción hexánica)	36	153	171
DE UN TOTAL=	167	279	239
<u>Aristolochia g.</u> (fracción etanólica)	63	135	324
DE UN TOTAL=	250	244	372
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)	198	288	243
DE UN TOTAL=	523	479	313
<u>Dioscorea composita</u> (glucósidos totales)	135	225	243
DE UN TOTAL=	542	422	333
Metotrexato	135	243	261
DE UN TOTAL=	302	377	275

EXPERIMENTO No.2

DOSIS	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml
COMPUESTO	M	M	M
<u>Aristolochia g.</u> (fracción hexánica)	216	585	603
DE UN TOTAL=	821	885	760
<u>Aristolochia g.</u> (fracción etanólica)	261	207	342
DE UN TOTAL=	667	339	398
<u>Dioscorea mexicana</u> (glucósidos totales)	189	423	576
DE UN TOTAL=	465	643	692
<u>Dioscorea composita</u> (glucósidos totales)	160	450	360
DE UN TOTAL=	596	760	451
Metotrexato	144	360	486
DE UN TOTAL=	291	517	493

Tabla No.4.29 Suma(de las nueve repeticiones)de la población celular no viable con su respectivo total de células(el total incluye células vivas y muertas),correspondiente a cada nivel de dosis en ambos experimentos.

EXPERIMENTO No.1

F.C.=FACTOR DE CORRECCION(4.35%)

DOJIS COMPUESTO	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml
	% DE CELULAS NO VIABLES		
<u>Aristolochia g.</u> (frac. hexánica)	21.56%	54.84%	71.55%
MENOS F.C.=	17.21%	50.49%	67.20%
<u>Aristolochia g.</u> (frac. etanólica)	25.20%	55.33%	87.10%
MENOS F.C.=	20.85%	50.98%	82.75%
<u>Dioscorea mexicana</u> (gluc. totales)	37.86%	60.13%	77.64%
MENOS F.C.=	33.51%	55.78%	73.29%
<u>Dioscorea composita</u> (gluc. totales)	24.91%	53.32%	72.97%
MENOS F.C.=	20.56%	48.97%	68.62%
Metotrexato	44.70%	64.46%	94.91%
MENOS F.C.=	40.35%	60.11%	90.56%

EXPERIMENTO No.2

F.C.=FACTOR DE CORRECCION(9.62%)

DOSIS COMPUESTO	10 ug/ml	100 ug/ml	1000 ug/ml
	% DE CELULAS NO VIABLES		
<u>Aristolochia g.</u> (frac. hexánica)	26.31%	66.10%	79.34%
MENOS F.C.=	16.69%	56.48%	69.72%
<u>Aristolochia g.</u> (frac. etanólica)	39.13%	61.06%	85.93%
MENOS F.C.=	29.51%	51.44%	76.31%
<u>Dioscorea mexicana</u> (gluc. totales)	40.65%	65.79%	83.24%
MENOS F.C.=	31.03%	56.17%	73.62%
<u>Dioscorea composita</u> (gluc. totales)	30.20%	59.21%	79.82%
MENOS F.C.=	20.58%	49.59%	70.20%
Metotrexato	49.48%	69.63%	98.58%
MENOS F.C.=	39.86%	60.01%	88.96%

Tabla No.4.30 Porcentaje de células no viables, aplicando el factor de corrección propio de cada experimento.

Prizeramente podemos observar que conforme aumenta la dosis del compuesto el porcentaje de las células no viables aumenta; el extracto de Aristolochia grandiflora en su fracción etanólica produce un mayor porcentaje de muerte en las células que la fracción hexánica, en cuanto a los extractos de Dioscorea el de mexicana presenta mayor porcentaje de muertes. En forma general el compuesto más activo de los probados fué el extracto de Dioscorea mexicana (glucósidos totales), con excepción del metotrexato (estándar positivo) que presenta mayor actividad; por lo tanto los compuestos probados tienen actividad de tipo citotóxica. También se observa que en la dosis de 100 ug/ml todas las sustancias, con excepción del estándar positivo (metotrexato), se presentan casi con un 50% de muerte celular.

En este método se hizo el análisis comparando compuesto por compuesto probado de un experimento a otro; debido a que se manejan tres resultados por sustancia probada, que corresponden a los tres niveles de dosis manejados

ANALISIS DE VARIANZA

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA de Aristolochia grandiflora
(fracción hexánica)

Puente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	10.64002	10.64002	0.02	0.908
Dentro gpos.	4	2818.835	704.7087		
TOTAL	5	2829.475			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	44.97	15.32654
	2	47.63	15.32654

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA de Aristolochia grandiflora
(fracción etanólica)

Puente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	1.2880	1.2880	0	0.969
Dentro gpos.	4	3008.239	752.0596		
TOTAL	5	3009.527			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	51.52667	15.83308
	2	52.45334	15.83308

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA de Dioscorea mexicana
(glucósidos totales)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	0.5162	0.5162	0	0.974
Dentro gpos.	4	1711.811	427.9526		
TOTAL	5	1712.327			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	54.19333	11.94365
	2	53.60667	11.94365

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA de Dioscorea composita
(glucósidos totales)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	0.8214	0.8214	0	0.972
Dentro gpos.	4	2410.504	602.6259		
TOTAL	5	2411.325			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	46.05	14.17305
	2	46.79	14.17305

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA de Metotrexato
(estándar positivo)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F	Probabilidad
Entre gpos.	1	0.7993	0.7993	0	0.973
Dentro gpos.	4	2497.88	624.4699		
TOTAL	5	2498.679			

TABLA DE MEDIAS Y ERRORES

EXPERIMENTO	#	MEDIA	ERROR ESTANDAR
	1	63.67333	14.42764
	2	62.94333	14.42764

En estos cinco análisis se observa al igual que en los otros métodos, que las probabilidades están por abajo de uno y los errores estándar son iguales para cada compuesto y en ambos experimentos. Por lo tanto esta técnica también tiene cierta reproducibilidad.

5. CONCLUSIONES

I.-Los objetivos fueron seleccionar y montar los métodos de cernimiento que aparecieran como más convenientes para una detección primaria de actividad biológica en extractos de plantas ó intermediarios sintéticos. En este sentido se seleccionaron después de una amplia revisión bibliográfica, los siguientes métodos: a) Bioensayo con Artemia salina L., b) Ensayo en Disco de Papa para la Evaluación de la Acción Antitumoral, c) Método Autobiográfico para valorar Actividad Antibacteriana ó Antifúngica y d) Viabilidad en Células Epiteliales; Método de Exclusión con Azul Tripan.

II.-Con el objeto de montar y poner a punto los métodos mencionados bajo los objetivos anteriores, se probaron una serie de extractos de plantas; de trabajos actualmente en curso en nuestro laboratorio, obteniéndose algunos resultados que aun que preliminares, son interesantes:

a).- Nectandra salicifolia muestra actividad citotóxica en papas.

b).- Las plantas del género Aristolochia mostrarón una actividad antitumoral en la prueba de inhibición del crecimiento

de tumores en papa, lo que representa un indicio preliminar de que el uso que se dá a estas plantas (como antitumorales) podría estar justificado

Finalmente, las fracciones de glucósidos totales y de furostanoles de Dioscorea mexicana resultan activos contra Candida albicans, no así los de Dioscorea composita; planta muy relacionada botánicamente y que posee mayoritariamente glucósidos espiroestánicos, lo cuál resulta interesante.

III.-Las plantas del género Aristolochia presentaron también actividad tóxica contra células, específicamente linfocitos; al igual que los glucósidos totales de Dioscorea mexicana y Dioscorea composita, en la prueba de viabilidad celular con azul tripan. Lo que a la larga puede ser el indicio de otra aplicación terapéutica (carcinostáticos) de estos géneros de plantas.

IV.-Por último parece importante recomendar; a) el uso de alguno ó de todos los métodos aquí presentados para el estudio sistemático de plantas medicinales y/o los intermediarios de síntesis, b) el estudio de las Aristolochias como citotóxicos y el de los furostanoles de Dioscorea mexicana como antifúngicos.

V.-Acerca del análisis estadístico(análisis de varianza)se concluye que los cuatro métodos seleccionados y llevados a cabo experimentalmente son reproducibles bajo las mismas condiciones en las que se realizarón.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Habermann E.; Can the future of Pharmacology be anticipated?
Trends in Pharmacological Sciences; vol.1-12, 56-59(1981).
- 2.- Goldstein A., Aronow L., Kalman S. M.; Farmacologia: 2a ed.,
cap.13, pag.857(1982).
- 3.- Fontaine J. and Reuse J.; Contractor Responses of the
Isolated Colon of the mouse to Morphine and some Opioid
peptides; British J. Pharmaceutical: vol.85, 861-867(1985).
- 4.- Andersson G. G. Rolf, Grundstrom N., Hedman S., Sorenby
L. and Wikberg E. S. Jarl; Effects of Triazoles on Smooth
Muscle Tone and Immunologically Released Bronchoconstric-
tive Mediators in vitro and in vivo; Acta Pharmacol. et
Toxicol.: vol.55, 418-421(1984).
- 5.- Schindler R.; Use of Cell Culture in Pharmacology; Annv.
Rev. Pharmacol.: vol.9, 393-406(1969).
- 6.- Ohta Y., Kohda K., Kimoto H., Okano T. and Kamazoe Y.;

- Citotoxicity of Fluorine-Containing Alkyl Alkanesulfonates to Cultured Leukemia L1210 Cells;Chem. Pharm. Bull.;vol. 36(7),2410-2416(1988).
- 7.- Cheng J. T.,Yang C. F. and Jou T. C.;Inhibitory Effect of l-Ascorbic acid on the Growth of Astrocytes in Cell Cultured;Neuropharmacology:vol.27(11),1179-1182(1988).
- 8.- Taylor G. P.,Soyano A.,Romano E. and Layrisse M.;Physiological Forms of Iron Affect Differently Proliferation and Ferritin Synthesis in Human Mononuclear Cells in vitro;Tohoku J. Exp. Med.:vol.153,285-293(1987).
- 9.- Toplin I.;Experiences with the Tissue Culture System in Large-Scale Cancer Chemotherapy Screening;Cancer Research vol.21,1042-1046(1961).
- 10.- Hussein A. K. and Al-Hassan W. J.;A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Trombin Activity;Tohoku J. Exp. Med.:vol.153,1-4(1987).
- 11.- Yamaguchi A.,Fukushi M.,Arai O.,Mizushima Y.,Sato Y.,

Shimizu Y., Tomidokoro K. and Takasugi N.; A Simple Method for Quantification of Biotinidase Activity in Dried Blood Spot and its Application to Screening of Biotinidase Deficiency; Tohoku J. Exp. Med.:vol.152,339-346(1987).

- 12.- Matsuzaki K., Handda T., Miyajima K., Mikura Y., Shimizu H. and Toguchi H.; Quantitative Analysis of Hemolytic Action of Lysophosphatidylcholines in vitro; Effect of Acyl Chain Structure; Chem. Pharm. Bull.:vol.36(11),4253-4260(1988).
- 13.- Jukna J. J. and Nicholson C. D.; The Effect of Denbufylline on the Viscosity of rat Whole Blood and on the Deformability (filterability) of rat Blood Cell Suspensions; Archives of Pharmacology:vol.335,445-448(1987).
- 14.- Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. E., Anderson B., Nichols D. E., Moore D. S., McLaughlin J. L., Powell R. G. and Smith C. J. Jr.; Modification and Evaluation of the Potato Disc Assay and Antitumor Screening of Euphorbiaceae seeds; Journal of Natural Products:vol.45(6),679-686 (1982).

- 15.- Braun A. C. and Steiner T.;Protoplasmatologia:vol.10,1
(1958).
- 16.- Lippincott J. A. and Lippincott E. B.;Ann. Rev. Microbiol.:
vol.29,377(1975).
- 17.- Braun A. C.;Prog. Exp. Tumor Res.:vol.15,165(1972).
- 18.- Anand V. K. and Heberlein G. T.;American J. Bot.:vol.64,
153(1977).
- 19.- Galsky A. G.;Plant. Physiol.:vol.65,184(1980).
- 20.- Meyer B. N.,Ferrigni N. R.,Putnam J. E.,Jacobsen L. B.,
Nichols D. E. and McLaughlin J. L.;Brine Shrimp:A Conven-
ient General Bioassay for Active Plant Constituents;
Planta Medica:vol.45,31-34(1982).
- 21.- Pelczar M. J. Jr.,Reid D. R.,Chan E. C. S.;Microbiologia;
4a. ed.,pages.2-3 y 426-428(1983).
- 22.- Homans A. L. and Fuchs A.;Direct Bioautography on Thin-

- Layer Chromatograms as a Method for Detecting fungitoxic substances; Journal Chromatog.:vol.51,327-329(1970).
- 23.- Lazarovits G., Brammall R. A. and Ward E. W. B.; Bioassay of Fungitoxic Compounds on Thin-Layer Chromatograms with Phythium and Phytophthora species; Phytopathology:vol.72(1), 61-63(1982).
- 24.- Peterson C. A. and Edgington L. V.; Quantitative Estimation of the Fungicide Benomyl Using a Bioautograph Technique; J. Agr. Food Chem.:vol.17(4),898-899(1969).
- 25.- Finney D. J.; Probit Analysis; 3a.ed., Cambridge(1971).
- 26.- Tennant J. R.; Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability; Transplantation:vol.2(6), 685-694(1964).
- 27.- Roitt I and Brostoff; Immunology; 4a. ed., pages.2511-2514(1984).
- 28.- Ficoll-PaqueTM; For in vitro Isolation of Lymphocytes; Pharmacia Fine Chemical(manual de 10 páginas).

29.- Espejo O., Del Amo S. and McLaughlin J.; Resultados Pendientes de Publicación.